N° 16. **E. Hadorn, G. E. Graf**[1] und **H. Ursprung,** Zürich.
Der Isoxanthopterin-Gehalt transplantierter Hoden von *Drosophila melanogaster* als nicht-autonomes Merkmal. (Mit 1 Textabbildung.)

(Aus dem Zoologisch-vergl. anatomischen Institut der Universität Zürich) [2].

1. Problemstellung

Der Imaginalhoden des Wildgenotypus von *Drosophila melanogaster* enthält sehr viel Isoxanthopterin (Hadorn und Mitchell 1951, Hadorn 1954). In den Ovarien finden sich dagegen nur Spuren dieser stark fluoreszierenden Substanz. Nun ist aber dieses „biochemische Geschlechtsmerkmal" nicht nur auf die Gonaden beschränkt. Hadorn und Ziegler-Günder (1958) zeigen, dass die Augen der männlichen Puppen rund doppelt soviel Isoxanthopterin enthalten als weibliche Augen gleichen Alters. Nach diesen Befunden musste man sich fragen, ob das Isoxanthopterin der Augen direkt durch die chromosomale Konstitution der Augenzellen selbst bestimmt wird. Ebenso naheliegend ist die Annahme, dass der Stoffgehalt der Augen indirekt durch Einflüsse bewirkt wird, die von den Gonaden oder von anderen Geschlechtsorganen ausgehen. Durch reziproke Transplantationen wurde bewiesen, dass Augenanlagen, die sich im Abdomen geschlechtsfremder Wirte entwickeln, nach ihrer Metamorphose eine Isoxanthopterinmenge enthalten, wie sie für den Wirtsgenotypus charakteristisch ist (Hadorn und Ziegler-Günder 1958). Somit verhält sich dieses Geschlechtsmerkmal nicht-autonom.

In der vorliegenden Arbeit untersuchen wir nun das Verhalten der Gonaden selbst. Wir möchten im besonderen wissen, ob ein implantierter Hoden im weiblichen Wirt ebensoviel Isoxanthopterin aufbaut oder speichert wie in einem männlichen Wirt.

Soweit bezieht sich die Versuchsanordnung auf Entwicklungssysteme, die sich lediglich in der geschlechts-chromosomalen Konsti-

[1] Aided by a post-doctoral fellowship grant of the American Cancer Society.
[2] Ausgeführt mit Unterstützung der Karl Hescheler-Stiftung.

tution unterscheiden. Mit der Mutante *rosy*^{2} *(ry*^{2}*)* stand uns ein Genotypus zur Verfügung, dessen Pterinstoffwechsel grundlegend von demjenigen der Wildform abweicht (HADORN und SCHWINCK 1956). Bei *ry*^{2} fehlt die Xanthinoxydase (oder die Xanthindehydrogenase). Dieses Enzym katalysiert in Genotypen, die das nichtmutierte Wildallel *(ry*$^+$ *)* enthalten, die Oxydation von 2-Amino-6-Oxypterin zu Isoxanthopterin (FORREST, GLASSMAN and MITCHELL (1956); HADORN, 1956 *b*).

Nun hatten bereits die ersten Experimente gezeigt, dass regelmässig auch in *ry*^{2}-Tieren Isoxanthopterin auftritt, falls Fettkörper oder Malpighische Gefässe des Wildgenotypus implantiert werden (HADORN und SCHWINCK 1956, HADORN 1956a, HADORN und GRAF 1958). Sehr wahrscheinlich liefern dabei die genetisch normalen Zellsysteme die notwendige Xanthinoxydase. Nachfolgend besprechen wir nun neue Experimentalserien (*ry*^{2} in +), bei denen das nicht-autonome Auftreten von Isoxanthopterin in *ry*^{2}-Hoden quantitativ genauer bestimmt wird. Die Ergebnisse vergleichen wir einerseits mit Kontrollimplantationen (+ in +), andererseits mit reziproken Transplantationen (+ in *ry*^{2}). Zudem wird auch bei diesen Experimenten untersucht, wie sich das Geschlecht des Wirtes auf die Pterine implantierter Hoden auswirkt.

In ihrer Gesamtheit sollen unsere Versuche einen Beitrag leisten zur Analyse der biochemischen Merkmalsbildung. Dabei können sowohl geschlechtsspezifische, wie auch genspezifische Grundlagen berücksichtigt werden.

2. MATERIAL UND METHODIK

Als Normalgenotypus verwendeten wir den Wildstamm Sevelen von *Drosophila melanogaster*, der seit einer Reihe von Jahren in unserem Institut gezüchtet wird. Als Transplantationspartner dient die Mutante *rosy*^{2} (*ry*^{2}; 3—51±1). Fast alle Kulturen wurden bei 25 ± 0,5° C gehalten. Einzig einige Implantatsserien mit *ry*^{2}-Männchen mussten bei 21° aufgezogen werden, da diese Genotypen bei höheren Temperaturen subvital bis semiletal sind (HADORN und SCHWINCK 1956).

Zur Implantation kamen frei präparierte Hoden des mittleren dritten Larvenstadiums (72 ± 2 Stunden). Die Empfänger waren etwas älter (78 ± 2 Stunden). Wir sezierten die Imagines einen

Tag nach dem Schlüpfen und zerrieben die lebensfrischen Hoden je einzeln auf dem Startflecken von Whatman No. 1-Papier. Chromatographiert wurde nach der von HADORN und MITCHELL (1951) eingeführten Methode. Die Isoxanthopterinmenge bestimmten wir in einer Apparatur, die erlaubt, das vom trockenen Papier ausgehende Fluoreszenzlicht des entwickelten Isoxanthopterinflecks direkt zu messen.

Im Bereiche der pro Hoden vorkommenden Stoffmenge besteht Linearität zwischen dem Ausschlag des Messinstrumentes und der Isoxanthopterinquantität. Dabei entspricht ein Messwert von 50 Einheiten annähernd einem Gamma Isoxanthopterin.

ABB. 1

Fluoreszenzintensität (Ordinate) als Mass der Isoxanthopterin-Menge pro Einzelhoden (Kreise). Die genetische Konstitution der Implantate und des Wirtes ist für die 8 Versuchsanordnungen (I—VIII) unten angegeben. Im männlichen Wirt ist zwischen freien (*a*) und angehefteten Hoden (*b*) unterschieden.

TABELLE 1.

Menge von Isoxanthopterin in Hoden bei verschiedenen Versuchsanordnungen (I—VIII). Die Mittelwerte beziehen sich auf n *Einzelhoden; angegeben ist die gemessene Intensität des vom Isoxanthopterin ausgehenden Fluoreszenzlichtes (in frei gewählten Einheiten). Bei den Implantaten in Männchen wird unterschieden zwischen freien Hoden* (*a*) *und angehefteten Hoden* (b).

Exp.	Impl.	Wirt	n	Mittelwert
I	+	+ ♀	21	4,4 ± 0,36
II *a*	+	+ ♂	15	10,7 ± 0,95
b	,,	,,	31	21,4 ± 1,06
III	*ry*²	ry² ♀	24	0,2 ± 0,10
IV *a*	*ry*²	*ry*² ♂	17	0,2 ± 0,18
b	,,	,,	30	0,7 ± 0,16
V	+	*ry*² ♀	22	0,3 ± 0,16
VI *a*	+	*ry*² ♂	9	0,4 ± 0,29
b	,,	,,	18	0,6 ± 0,20
VII	*ry*²	+ ♀	21	3,6 ± 0,43
VIII *a*	*ry*²	+ ♂	26	11,6 ± 0,39
b	,,	,,	52	20,3 ± 0,50

3. ERGEBNISSE

Alle Einzelbefunde sind in der Abbildung 1 aufgetragen. Die Mittelwerte und ihre Fehler haben wir in der Tabelle 1 angegeben. Im ganzen ergeben sich acht Versuchsanordnungen (I—VIII). Dabei wird bei der Implantation in männliche Wirte noch unterschieden zwischen den Hoden, die sich frei im Abdomen entwickelten und denjenigen, die in normaler Weise an die Vasa deferentia angeheftet wurden (Unterserien *a* und *b*).

a) *Unterschiede zwischen freien und angehefteten Hoden*

Wird ein Hoden in eine männliche Wirtslarve implantiert, so stehen in der Metamorphose für die nun vorhandenen drei Gonaden nur zwei Anheftungsstellen zur Verfügung. Ein Hoden bleibt daher frei, oder er verwächst mehr oder weniger eng mit einem angehefte-

ten Hoden. Nach STERN und HADORN (1938) hat auch der implantierte Hoden eine gute Chance, sich mit einem Vas deferens zu verbinden. Daher können wir später in unseren Versuchsserien bei der Sektion der Imagines nicht unterscheiden, ob ein Wirtshoden oder der implantierte Hoden frei blieb.

Freie Hoden entwickeln sich histologisch normal, verändern aber ihre ovoide larvale Form kaum. Dagegen wachsen angeheftete Hoden zu langen, spiralig aufgewundenen Schläuchen aus (STERN und HADORN 1938).

Wir haben in allen Versuchsserien mit männlichen Wirten die freien Hoden zu einer Messgruppe (IIa, IVa, VIa und VIIIa) zusammengefasst. Dabei werden auch Hoden berücksichtigt, die nur leicht mit den angehefteten Hoden verwachsen waren. Der Isoxanthopteringehalt der freien Hoden kann nun verglichen werden mit den Messwerten der ebenfalls einzeln chromatographierten angehefteten Hoden (Serien IIb, IVb, VIb und VIIIb).

Aus den Doppelserien II und VIII geht klar hervor, dass ein angehefteter Hoden rund doppelt soviel Isoxanthopterin enthält als ein freier Hoden. Wahrscheinlich beruht dieser Unterschied lediglich darauf, dass angeheftete Hoden grösser werden als freie Hoden. Ausserdem wurde zusammen mit einem angehefteten Hoden auch das Vas deferens gemessen. Somit würde die Isoxanthopterinmenge proportional mit der Organgrösse ansteigen.

b) *Geschlechtsspezifische Wirkungen des Wirtes*

Da implantierte Hoden im weiblichen Abdomen sich nicht an Vasa deferentia anheften können und daher ovoid und frei bleiben, vergleichen wir ihren Isoxanthopteringehalt mit den freien Hoden aus männlichen Wirten. Aus einer Gegenüberstellung der Serien I mit IIa und VII mit VIIIa ergibt sich, dass ein freier Hoden im Männchen 2—3 mal mehr Isoxanthopterin enthält als im Weibchen. Hier bestehen zwischen den verglichenen Versuchsgruppen keine wesentlichen Unterschiede in der Hodengrösse. Somit erscheint der Isoxanthopteringehalt eines Hodens als ein „biochemisches Merkmal", das vom geschlechtsspezifischen Genotypus des Gesamtorganismus abhängig ist. Dabei müssen verschiedene Deutungen erwogen werden,

zwischen denen wir zur Zeit nicht entscheiden können. Vielleicht liefert der weibliche Wirt zu wenig Substrat, vielleicht erreicht im weiblichen Milieu die Xanthinoxydase nicht das männliche Niveau oder es geht von der weiblichen Umgebung ein Einfluss aus, der die Isoxanthopterinsynthese weitgehend hemmt (vergl. HADORN und GRAF 1958).

c) *Nicht-Autonomie für Wirkungen des* rosy-*Locus*

Wie einleitend erläutert wurde, bildet die Mutante *rosy*^{2} (*ry*^{2}) kein Isoxanthopterin. So sehen wir denn auch in den Hodenchromatogrammen der Serien III und IV keine Spur dieses Stoffes. Die in Abbildung 1 und Tabelle 1 angegebenen sehr tiefen Mittelwerte der Fluoreszenzmessungen beruhen nicht auf Isoxanthopterin, sondern auf schwachen Fluoreszenzen, die von anderen Pterinen ausgehen.

Die reziproken Transplantationen zeigen, dass über Vorkommen oder Fehlen von Isoxanthopterin einzig der Genotypus des Wirtes entscheidet. Hoden der Wildrasse (+) enthalten im *ry*^{2} – Wirt kein Isoxanthopterin (Serien V und VI). Andererseits messen wir in den meisten *ry*^{2}-Hoden, die sich in weiblichen +-Wirten entwickeln (Serie VII) ansehnliche Mengen von Isoxanthopterin. Die Messdaten streuen dabei über den gleichen Bereich wie in der Serie I, wo + -Wirte verwendet wurden. Entsprechende Befunde ergeben sich aus den Implantationen in + -Männchen (Serie VIII). Obschon hier ein Drittel aller Hoden von *ry*^{2}-Genotypus sind, finden wir keine Implantate ohne Isoxanthopterin, und es stimmen die Streuungsbereiche wie auch die Mittelwerte völlig mit der Kontrollserie II überein.

Irgendwelche Einflüsse des Genotypus der Implantate werden nirgends manifestiert.

Diese nicht-autonome Merkmalsbildung kann durch die Annahme erklärt werden, dass der Hoden das Isoxanthopterin nicht selbstdifferenzierend bilden kann. Dieses biochemische Merkmal erscheint daher als Allophän (HADORN 1955). Es handelt sich somit um ein Erbmerkmal, das in den Hoden von „aussen" her, d. h. durch die in anderen Zellsystemen des Organismus manifeste Erbkonstitution verursacht wird. Ob dabei die Umgebung dem Hoden die Xanthinoxydase

liefert, oder eine Vorstufe für die Pterinsynthese oder gar fertige Isoxanthopterin-Moleküle zur Verfügung stellt, können wir auf Grund der bisherigen Versuche nicht entscheiden.

Befunde früherer Experimente (HADORN und SCHWINCK 1956) weichen zum Teil von den vorliegenden neuen Experimenten ab. Damals wurde festgestellt, dass ein in *rosy*^{2} implantierter + -Hoden doch etwas Isoxanthopterin enthalten kann und auch auf die Wirtshoden eine knapp messbare Wirkung ausübt. Nun wurden aber diese früheren Versuche mit einem anderen *ry*^{2}-Stamm ausgeführt, der u. a. auch noch das Gen *cinnabar* (*cn*) enthielt, so dass möglicherweise andere genphysiologische Bedingungen vorlagen. Jedenfalls ist für unsere neuen, grösseren und messbar erfassten Implantationsserien eine völlige Nicht-Autonomie für das Auftreten oder das Fehlen von Isoxanthopterin im Hoden nachgewiesen.

d) *Die übrigen Pterine*

Da einzelne Hoden nur geringe Mengen der übrigen Pterine enthalten, die zum pleiotropen Wirkungsmuster des *rosy*-Locus gehören, verzichten wir auf Angaben der noch nicht genügend gut gesicherten Messdaten. Immerhin liesse sich zeigen, dass dort, wo sich kein Isoxanthopterin im Hoden findet, erwartungsgemäss das 2-Amino-6-Oxypterin stärker vertreten ist als in den Hoden mit Isoxanthopterin. Wie sehr das Auftreten dieser beiden Pterine negativ korreliert sein kann, haben HADORN und GRAF (1958) mit verschiedenen Versuchsanordnungen gezeigt. Wahrscheinlich ist auch der Gehalt von 2-Amino-6-Oxypterin des Hodens als nicht-autonomes Merkmal aufzufassen.

SUMMARY

1. The influence of host sex and genotype on the isoxanthopterin content of transplanted testes has been studied by means of paper chromatography and fluorescence measurements.
2. Attached testes contain the order of twice as much isoxanthopterin as unattached testes. Since attached testes are larger, this difference may be due to size alone.
3. Unattached testes in a male host contain 2—3 times as much isoxanthopterin as testes developing in a female host. Since

these testes are of approximately the same size, this difference must be attributed to host sex.

4. In experiments dealing with the mutant ry^2 it was found that the host genotype is decisive. Testes of ry^2 and + genotype in a + host contain equal amounts of isoxanthopterin, but in a ry^2 host, male or female, no isoxanthopterin was formed in donor or host testes regardless of implant genotype. The hypothesis is advanced that the enzyme xanthine oxidase, which is necessary for isoxanthopterin formation and which ry^2 lacks, if formed outside the testes.

LITERATUR

Forrest, H. S., E. Glassman and H. K. Mitchell. 1956. *Conversion of 2-Amino-4-Hydroxypteridine to Isoxanthopterine in D. melanogaster.* Science 124: 725-726.

Hadorn, E. 1954. *Ontogenetische Änderungen im Gehalt an Isoxanthopterin bei verschiedenen Genotypen von Drosophila melanogaster.* Experientia 10: 483-484.

— 1955. *Letalfaktoren in ihrer Bedeutung für Erbpathologie und Genphysiologie der Entwicklung.* Stuttgart: Georg Thieme.

— 1956*a*. *Patterns of Biochemical and Developmental Pleiotropy.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21: 363-373.

— 1956*b*. *Erbkonstitution und Merkmalsbildung.* Verh. Schweiz. Naturf. Ges. (Basel) 52-56.

Hadorn, E. und G. E. Graf. 1958. *Weitere Untersuchungen über den nicht-autonomen Pterinstoffwechsel der Mutante rosy von Drosophila melanogaster.* Zool. Anz. im Druck.

— and H. K. Mitchell. 1951. *Properties of mutants of Drosophila melanogaster and changes during development as revealed by paper chromatography.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 37: 650-665.

— und I. Schwinck. 1956. *Fehlen von Isoxanthopterin und Nicht-Autonomie in der Bildung der roten Augenpigmente bei einer Mutante (rosy ²) von Drosophila melanogaster.* Z. Vererbungslehre 87: 528-553.

— und I. Ziegler-Günder. 1958. *Untersuchungen zur Entwicklung, Geschlechtsspezifität und phänogenetischen Autonomie der Augen-Pterine verschiedener Genotypen von Drosophila melanogaster.* Z. Vererbungslehre 89: 221-234

Stern, C. and E. Hadorn. 1938. *The Determination of Sterility in Drosophila Males without a complete Y-Chromosome.* Amer. Nat. 72: 42-52.